

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕНА *PHOMA BETAE* С ПОМОЩЬЮ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО СЕНСОРА

Е.В.Халдеева, Э.П.Медянцева, Н.И. Глушко*, Г.К.Будников
Казанский государственный университет
420008, Казань, Кремлевская, 18
e-mail: Elvina.Medyantseva@ksu.ru

* Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии
420015, Казань, К. Маркса, 67

Поступила в редакцию 24 января 2001г.

Предложен новый вариант иммуноанализа с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора для определения антигена фитопатогенного гриба *Phoma betae* с целью выявления грибковых заболеваний растений. Подобраны наилучшие условия функционирования разработанного сенсора. Проведено определение антигена *Phoma betae* в образцах корнеплодов и семян, показана возможность использования предлагаемого метода для раннего выявления грибковых заболеваний.

Будников Герман Константинович - доктор химических наук, профессор, академик МАНВШ, член-корреспондент РАЕН, заведующий кафедрой аналитической химии Казанского государственного университета.

Область научных интересов: электрохимические методы анализа, биосенсоры, модифицированные электроды, экоаналитический контроль.

Автор более 600 опубликованных работ.

Медянцева Эльвина Павловна - доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Казанского государственного университета.

Область научных интересов: электроаналитическая химия, ферментативный катализ, биосенсоры, электрокатализ, иммунохимический анализ.

Автор 115 опубликованных работ.

Халдеева Елена Владимировна - аспирант кафедры аналитической химии Казанского государственного университета.

Область научных интересов: вольтамперометрия, электрохимический иммуноанализ, биохимия, анализ биологически активных веществ.

Автор 5 опубликованных работ.

Глушко Надежда Ивановна - заведующая лабораторией по разработке грибковых аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии.

Область научных интересов: иммунология, аллергология, микология, диагностические и лечебные аллергены.

Автор 37 опубликованных работ.

Проблема контроля качества пищевой продукции за последние годы приобрела еще большую актуальность. Это связано не только с загрязнением окружающей среды вследствие хозяйственной деятельности человека, результатом чего является присутствие в пищевых продуктах пестицидов, полиароматических углеводородов, диоксинов и т.п., но и со значительным расширением круга потенциально опасных веществ. Последние десятилетия ознаменовались значительным ростом количества аллергических заболеваний. Одной из причин этого является неблагоприятная экологическая обстановка и, как следствие, ухудшение здоровья населения в целом.

Фитопатогенный гриб *Phoma betae* является одной из главных причин потерь сельскохозяй-

ственной продукции при хранении. Заражение этим грибом вызывает поражение корней всходов свеклы, пятнистость листьев и сухую гниль корнеплодов свеклы, что приводит к снижению вкусовых и товарных качеств сельскохозяйственной продукции [1]. Помимо этого, употребление в пищу зараженных корнеплодов может привести к появлению аллергических заболеваний, представляющих наибольшую опасность для детей в возрасте до 10 лет. Первоначально возникая как пищевая аллергия, это заболевание переходит в сенсибилизацию к грибковому аллергену (антигену *Phoma betae*), вызывая появление различных аллергических реакций при контакте с ним [2].

Поскольку явные признаки заболевания проявляются на всходах и корнеплодах лишь спустя

2-3 недели после заражения, эффективность применения фунгицидов снижается. Инфекция прогрессирует при влажной и теплой погоде и сохраняется в зараженных семенах, что приводит к ее дальнейшему распространению.

Контроль качества сельскохозяйственной продукции, используемой для непосредственного употребления и переработки, является достаточно сложной задачей. Для ее решения в последние годы помимо традиционных методов с успехом применяют различные биосенсоры [3]. Использование разных вариантов иммуноанализа является одним из наиболее перспективных способов выявления бактериального и грибкового загрязнения пищевых продуктов. Помимо ставшего уже традиционным твердофазного иммуноферментного анализа, основанного на методах спектрофотометрии [4] и введении радиоактивных или флуоресцентных меток в один из компонентов биоспецифического взаимодействия, большого интереса заслуживает также разработка иммуносенсоров - аналитических устройств, включающих биологически чувствительный элемент, в качестве которого выступают антитела или антигены, тесно связанный или интегрированный с физическим преобразователем.

Перспективность использования иммуносенсоров показана на примерах определения различных фармпрепаратов [5, 6], антигенов [7, 8], а также бактерий [9-11]. Такие сенсоры сочетают преимущества высокочувствительной электрохимической детекции аналитического сигнала со специфичностью действия как ферментов, так и иммунологической реакции.

Целью данной работы является разработка амперометрического иммуноферментного сенсора для определения антигена *Phoma betae* (PhB), оценка его аналитических возможностей и практического использования для выявления грибкового заболевания в растительных образцах.

Экспериментальная часть

Работа выполнена на осциллографическом полярографе ПО-5122 модели 03 с ячейкой, термостатированной при $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ с помощью термостата ТС-50. Рабочим электродом служил иммуноферментный сенсор (ИФС), состоящий из стационарного ртутно-пленочного электрода с серебряной подложкой с диаметром рабочей поверхности 0.5 мм и биочувствительной части. Последняя содержит совместно иммобилизованные фермент холинэстеразу и антитела (Ат) против PhB в различных разведениях. В качестве электрода сравнения использовали насыщен-

ный каломельный электрод. Растворенный кислород удаляли током электролитически генерированного водорода.

Применяли препараты бутирилхолинэстеразы (ХЭ), полученные из сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8), изготовленные Пермским НИИ вакцин и сывороток, с активностью 70 АЕ/мг. В качестве субстрата ХЭ использовали перекристаллизованный бутирилтиохолин иодид (БТХИ), раствор которого готовили по точной навеске. Измерения проводили в боратном ($\text{pH } 9.05 \pm 0.05$) и аммиачном ($\text{pH } 9-10$) буферных растворах, приготовленных из препаратов марки "ХЧ" и "ЧДА". Для получения биочувствительной части ИФС использовали нитрат целлюлозы типа коллоксилин, органические растворители (бутилацетат, толуол, гексан) марки "хч" и 25 % раствор глутарового альдегида фирмы "Reanal".

Использовали раствор соли Co(II) с концентрацией $4 \cdot 10^{-4}$ М, исходную концентрацию его определяли комплексонометрическим титрованием.

Применяли антиген PhB (Ag) и Ат против PhB, полученные в лаборатории грибковых аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии. Ag PhB получен методом водно-солевой экстракции высушенного этанолом мицелия гриба с последующим фракционированием этанолом по оригинальной методике, разработанной в лаборатории грибковых аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии. Поликлональные Ат получены методом ступенчатой иммунизации.

Концентрации исходных водных растворов Ag и Ат определяли спектрофотометрически при температуре 25°C и $\lambda = 280$ нм. Концентрация антигенов в разведении 1:10 составляла 0.12 мг/мл. Исходная концентрация антигена PhB - 1.1 мг/мл.

Для получения биочувствительной части ИФС нитрат целлюлозы растворяли в смеси органических растворителей (толуол и бутилацетат), добавляли водный раствор ХЭ и Ат в различных разведениях (1:10, 1:20, 1:50). После перемешивания добавляли глутаровый альдегид и несколько капель гексана. Из этой смеси на стеклянной поверхности чашки Петри получали пленку, которую высушивали в потоке воздуха. Готовые пленки хранили в холодильнике при температуре 4°C . В работе использовали пленки площадью 7.95 ± 0.5 см². Перед использованием таких пленок в иммуноанализе их помещали на 30 минут при комнатной температуре в водный раствор бычьего сывороточного альбумина для предотвращения неспецифического связывания и блокирования активных участков глутарового альдегида. Удельную активность иммобилизован-

ной холинэстеразы (ИХЭ) определяли по количеству продукта, выделившегося в ходе ферментативной реакции в присутствии или в отсутствие эффектора за единицу времени в расчете на квадратный сантиметр рабочей поверхности биочувствительной части.

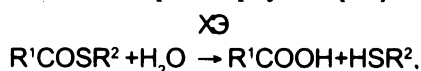
Подготовку рабочей поверхности электрода осуществляли, как описано в работе [12].

Результаты и их обсуждение

Биочувствительная часть разработанного иммуноферментного сенсора для определения *Ag Phb* включает в себя иммобилизованные Ат против *Phb* в различных разведениях и иммобилизованную ХЭ (ИХЭ). Установлено, что введение антител в состав биочувствительной части незначительно сказывается на удельной каталитической активности ИХЭ. Величина удельной активности фермента в отсутствие иммобилизованных Ат составляла 13.8 ± 0.3 , а в их присутствии 14.9 ± 0.5 мМ/мин.см².

Прочность удерживания Ат в матрице проверяли по наличию или отсутствию каталитических волн выделения водорода, которые наблюдаются на стационарном ртутно-пленочном электроде с серебряной подложкой в аммиачном буферном растворе в присутствии солей Co(II) и белка при потенциале -1.4 - -1.5 В [13, 14]. Для этого биочувствительную часть ИФС выдерживали при перемешивании в воде в течение 15-20 минут, добавляли раствор соли Co(II) и аммиачный буфер и регистрировали вольтамперограмму. Данная электрохимическая реакция достаточна чувствительна и позволяет определять до $1 \cdot 10^{-10}$ моль/л соединений белковой природы. Отсутствие волны каталитического выделения водорода в этом случае свидетельствует о том, что используемый способ иммобилизации позволяет прочно связать ХЭ и Ат против *Phb* с матрицей из нитрата целлюлозы.

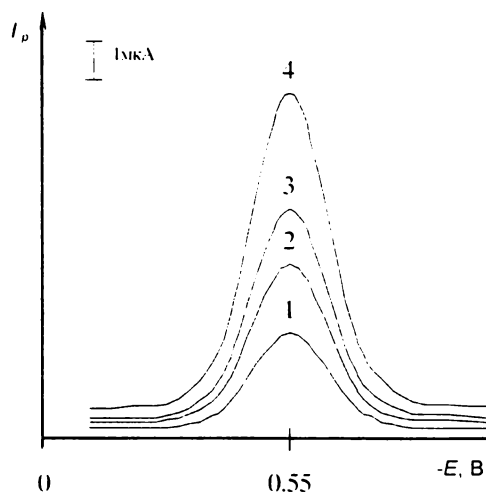
В основе предлагаемого варианта иммуноферментного анализа с использованием ИФС лежит реакция образования иммунного комплекса Ат-Аг на поверхности биочувствительной части сенсора с оценкой степени этого взаимодействия по величине аналитического сигнала. В качестве аналитического сигнала служила высота катодного пика при потенциале -0.55 В, который отвечает электрохимическому процессу восстановления продукта реакции тиола (R^2SH), образующемуся в результате катализируемого ХЭ гидролиза специфических серосодержащих субстратов, с материалом электрода - ртутью [15]:



где R^1 : $-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{C}_3\text{H}_7$, $-\text{C}_4\text{H}_9$, R^2 : $-(\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$.

Величина аналитического сигнала зависит от многих факторов: используемой фермент-субстратной системы, концентрации субстрата, pH раствора, активности ИХЭ [7, 12], наличия в растворе эффекторов фермента [16], начального потенциала поляризации [17].

При отсутствии в растворе *Ag Phb*, но в присутствии ИФС происходит обычный гидролиз специфического субстрата ХЭ (см. уравнение и рисунок, кривую 1). При введении в исследуемый раствор *Ag Phb* происходит его связывание со специфическими антителами, иммобилизованными в матрицу из нитрата целлюлозы с образованием иммунного комплекса Ат-Аг. Изменение высоты катодного пика при потенциале -0.55 В наблюдается только при добавлении в исследуемый раствор *Ag Phb*, т.е. именно образующийся иммунный комплекс Ат-Аг выполняет в данном случае роль эффектора ИХЭ, не действуя на другие компоненты биоспецифического взаимодействия (см. рисунок, кривые 2, 3, 4).



Оцилловольтамперограммы: 1 - растворов БТХИ с концентрацией $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л на фоне боратного буферного раствора с pH 9.05 в присутствии ИФС; (2-4) - то же самое, но в присутствии антигена *Phoma betae* при использовании различных разведений антител для получения биочувствительной части ИФС: 2 - 1:10; 3 - 1:50 и 4 - 1:20

Установлено, что в зависимости от условий иммунный комплекс оказывает различное по величине действие на ИХЭ. В присутствии определенных концентраций Ат и *Ag Phb* наблюдается увеличение аналитического сигнала, по сравнению с контрольным опытом в отсутствие *Ag Phb*, т.е. образование иммунного комплекса приводит к увеличению каталитической активности ИХЭ. Величина этого эффекта зависит от концентрации антител, используемых для получения биочувствительной части сенсора, а также pH и концентрации субстрата.

Для выбора оптимальных условий проведения иммунохимического анализа представляло интерес определить значения кинетических параметров кажущихся констант Михаэлиса и максимальных скоростей ферментативной реакции гидролиза БТХИ, лежащей в основе действия

ИФС для определения антигена *PhB*. Значения кинетических параметров ферментативной реакции при различных pH раствора и концентрациях субстрата в присутствии и в отсутствие различных концентраций Аг представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Кинетические параметры ферментативной реакции при концентрации субстрата $2 \cdot 10^{-3}$ М и разведении антител 1:20

pH	C_{Ag} , мг/мл	$V_m \cdot 10^7$, мг/мл·с	$K_m(\text{каж}) \cdot 10^4$, мг/мл	Вид эффекта
8.7	0	$3,6 \pm 0,4$	$25,1 \pm 0,9$	Двухпараметрически согласованная активация Двухпараметрически рассогласованная активация Двухпараметрически согласованная активация
	$5 \cdot 10^{-6}$	$3,8 \pm 0,5$	$8,3 \pm 0,7$	
	$5 \cdot 10^{-8}$	$4,0 \pm 0,4$	$78,1 \pm 1,5$	
	$5 \cdot 10^{-10}$	$3,8 \pm 0,4$	$21,4 \pm 0,3$	
9.05	0	$3,8 \pm 0,4$	$21,7 \pm 1,2$	Ассоциативная активация
	$5 \cdot 10^{-6}$	$3,8 \pm 0,3$	$9,6 \pm 0,8$	
	$5 \cdot 10^{-8}$	$3,8 \pm 0,5$	$16,3 \pm 0,5$	
	$5 \cdot 10^{-10}$	$3,8 \pm 0,4$	$6,1 \pm 0,4$	
9.4	0	$3,5 \pm 0,3$	$22,7 \pm 1,3$	Двухпараметрически согласованная активация Двухпараметрически рассогласованная активация Псевдоактивация
	$5 \cdot 10^{-6}$	$3,6 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,3$	
	$5 \cdot 10^{-8}$	$3,8 \pm 0,5$	$33,3 \pm 0,4$	
	$5 \cdot 10^{-10}$	$3,4 \pm 0,3$	$5,5 \pm 0,3$	

Таблица 2

Кинетические параметры ферментативной реакции при pH 9.05 и разведении антител 1:20

C_s , М	C_{Ag} , мг/мл	$V_m \cdot 10^7$, мг/мл·с	$K_m(\text{каж}) \cdot 10^4$, мг/мл	Вид эффекта
$1 \cdot 10^{-3}$	0	$3,5 \pm 0,5$	$50,7 \pm 1,5$	Двухпараметрически согласованная активация
	$5 \cdot 10^{-6}$	$3,9 \pm 0,4$	$13,2 \pm 0,9$	
	$5 \cdot 10^{-8}$	$3,6 \pm 0,3$	$47,9 \pm 1,8$	
	$5 \cdot 10^{-10}$	$3,8 \pm 0,5$	$15,1 \pm 0,8$	
$2 \cdot 10^{-3}$	0	$3,8 \pm 0,4$	$21,7 \pm 1,2$	Ассоциативная активация
	$5 \cdot 10^{-6}$	$3,8 \pm 0,3$	$9,6 \pm 0,8$	
	$5 \cdot 10^{-8}$	$3,8 \pm 0,5$	$16,3 \pm 0,5$	
	$5 \cdot 10^{-10}$	$3,8 \pm 0,4$	$6,1 \pm 0,4$	

Полученные данные позволяют выбрать оптимальную концентрацию субстрата (БТХИ) $1 \cdot 10^{-3}$ М и pH 9.05 для проведения иммунохимического определения Аг *PhB*. Двухпараметрически согласованная активация, наблюдаемая при этих условиях, характеризуется увеличением максимальной скорости и усилением связывания фермента с субстратом в присутствии иммунного комплекса антитело-антиген. Наблюдаемая при использовании более высокой концентрации суб-

страта ассоциативная активация, для которой характерно усиление прочности связывания фермента с субстратом при постоянстве максимальной скорости, является менее предпочтительной с точки зрения аналитических характеристик регистрируемого сигнала. Таким образом, использование концентрации субстрата $1 \cdot 10^{-3}$ М и pH 9.05 позволяет получить наибольший по величине аналитический сигнал при максимальной каталитической активности ИХЭ.

Использование различных разведений Ат для получения биочувствительной части иммуноферментного сенсора позволяет наблюдать различное по величине активирующее действие иммунного комплекса на ИХЭ (табл.3). При разведении Ат 1:10 активирующее действие выражено слабо, что связано, возможно, с некоторы-

ми препятствиями для подхода субстрата к активным центрам фермента вследствие образования на поверхности биочувствительной части сенсора иммунного комплекса. Уменьшение концентрации Ат (разведение 1:20) позволяет наблюдать больший по величине активирующий эффект в более широком диапазоне концентраций.

Таблица 3

Область рабочих концентраций для определения антигена *Phoma betae* с помощью иммуноферментного сенсора

Разведение Ат	Область рабочих концентраций, мг/мл	Нижняя граница определяемых содержаний, мг/мл
1:10	$5 \cdot 10^{-11}$ - $1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-11}$
1:20	$5 \cdot 10^{-12}$ - $8 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-12}$
1:50	$1 \cdot 10^{-9}$ - $5 \cdot 10^{-6}$	$8 \cdot 10^{-10}$

Наблюдаемые явления могут быть обусловлены тем, что именно при данной концентрации Ат реализуются наиболее удобные пути для подхода субстрата к активным центрам, связанные с образованием соответствующей конформации фермента. Однако основной причиной, по-видимому, является дополнительное электростатическое взаимодействие молекул субстрата с компонентами биоспецифического взаимодействия, поскольку Ag *PhB* характеризуется изоэлектрической точкой 7.1 и в условиях эксперимента имеет общий отрицательный заряд, который может перекрыть общие заряды фермента и Ат при образовании иммунного комплекса Ат-Аг. Используемый же субстрат ХЭ (БТХИ) имеет положительно заряженную катионную головку. Все это может привести к участию дополнительных молекул субстрата в ферментативном процессе, что и отражается на увеличении аналитического сигнала при данном соотношении компонентов биоспецифического взаимодействия.

При использовании разведения Ат 1:50 наблюдается более резкое снижение активирующего действия иммунного комплекса, что может быть связано с уменьшением числа мест связывания Ат с Аг. При этом уменьшается возможность дополнительного электростатического взаимодействия молекул субстрата БТХИ с компонентами биоспецифического взаимодействия, что и объясняет более узкий диапазон концентраций, в котором наблюдается активирующее действие иммунного комплекса.

Аналитические характеристики разработанного ИФС для определения Ag *PhB* представлены в табл. 4. Полученные результаты показывают, что линейная зависимость между величиной аналитического сигнала и концентрацией Ag *PhB* сохраняется в широком концентрационном диапазоне. Показана возможность определения Ag *PhB* с помощью разработанного ИФС, правильность результатов оценена методом "введено - найдено" (табл.4).

Таблица 4

Определение антигена *Phoma betae* с помощью иммуноферментного сенсора (n=5; p=0.95)

Разведение Ат	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	S _r
1:10	$7 \cdot 10^{-7}$	$(6,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,03
	$7 \cdot 10^{-9}$	$(7,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-9}$	0,04
	$7 \cdot 10^{-11}$	$(7,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-11}$	0,08
1:20	$7 \cdot 10^{-6}$	$(7,4 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$	0,06
	$7 \cdot 10^{-8}$	$(7,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-8}$	0,04
	$7 \cdot 10^{-10}$	$(7,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-10}$	0,06
	$7 \cdot 10^{-11}$	$(6,9 \pm 0,6) \cdot 10^{-11}$	0,08
1:50	$7 \cdot 10^{-7}$	$(6,8 \pm 0,5) \cdot 10^{-7}$	0,07
	$7 \cdot 10^{-8}$	$(7,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-8}$	0,08

В связи с тем, что в основе предлагаемого варианта иммуноанализа лежит образование иммунного комплекса на поверхности биочувствительной части ИФС, определение констант связывания позволяет с количественной стороны оценить специфичность связывания антигена с антителом. Полученные с помощью графика Скэтчарда эффективные значения констант связывания составили $K_{a1} = (4.9 \pm 0.4) \cdot 10^{10}$ моль⁻¹ и $K_{a2} = (8.2 \pm 0.3) \cdot 10^8$ моль⁻¹, что свидетельствует о прочности образующегося иммунного комплекса Ат-Аг.

Перекрестная реактивность антител являет-

ся одной из наиболее важных проблем при разработке селективного и чувствительного метода иммуноанализа. Изучение перекрестной реактивности антител против антигена PhB показало, что используемые Ат не взаимодействуют с антигенами таких фитопатогенных грибов, как *Alternaria tenuis*, *Cladosporium Herbarum*, *Aspergillus fumigatus* и *Phytophthora infestans*, а также патогенных грибов *Candida albicans* и *Trichophyton rubrum*.

Полученные результаты были использованы для проведения количественного анализа PhB в образцах корнеплодов и семян. Некоторые из полученных результатов приведены в табл.5.

Таблица 5

Использование амперометрического иммуноферментного сенсора для определения грибковых антигенов *Phoma betae* в растительных образцах (n=5; p=0.95)

№ п/п	Образец	Видимые признаки заболевания	Найдено, мг/мл	S _r
1	Корнеплоды моркови	+	$(8,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,02
2		+	$(3,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-8}$	0,09
3		-	$(4,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-10}$	0,13
4	Семена моркови	+	$(6,7 \pm 0,5) \cdot 10^{-10}$	0,07
5	Корнеплоды свеклы	+	$(5,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,04
6		+	$(7,1 \pm 0,6) \cdot 10^{-8}$	0,08
7	Семена свеклы	-	$(4,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-10}$	0,06
8		-	$(4,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-9}$	0,11
9		-	$(2,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-10}$	0,14

+ Наличие явных признаков грибкового заболевания;

- Отсутствие видимых признаков грибкового заболевания.

Методика определения. Образцы клубней моркови и свеклы промывали дистиллированной водой и на 12 часов помещали в 70 %-ный этанол. Затем их высушивали при комнатной температуре и растирали до однородного состояния в фарфоровой ступке. Навеску полученного гомогената (0.8 - 1.5 г) или образцы семян экстрагировали 0.75 %-ным раствором КС I из расчета 10 мл на 1 г образца в течение 6 часов. Затем экстракт отфильтровывали и фильтрат использовали для анализа. В качестве стандарта использовали незараженный образец. В мерную колбу на 5 мл вводили $0.5 \text{ мл } 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л раствора БТХИ. 0.5 мл полученного фильтрата и доводили до метки боратным буферным раствором с pH 9.05. Раствор перемешивали и переносили в электрохимическую ячейку с насыщенным каломельным электродом и ИФС. После удаления кислорода в течение 15 минут регистрировали осцилловольт-амперограмму в интервале потенциалов от -0.1 до -1.0 В (скорость наложения потенциала 1 В/с, непрерывный режим поляризации, треугольная

развертка потенциала). Измеряли высоту катодного пика при потенциале -0.55 В. Неизвестную концентрацию находили по градуировочному графику зависимости тока от концентрации Аг PhB.

Из данных табл. 5 следует, что предлагаемый ИФС дает возможность определения Аг PhB на ранних стадиях развития заболевания, т.е. тогда, когда еще не наблюдается видимых поражений (см. табл. 5, позиции 3, 7), а также проводить оценку качества семян. Все это способствует своевременному выявлению заболевания и дает возможность принять меры для предотвращения дальнейшего развития заболевания.

Таким образом, разработанный вариант ИФА с помощью иммуноферментного сенсора позволяет оценить степень поражения растений и своевременно определить наличие Аг PhB в анализируемых образцах. Этот вариант иммуноанализа с помощью ИФС сопоставим по своим возможностям с другими вариантами данного метода, однако выгодно отличается от них отсутствием

многостадийности, простотой выполнения, и как следствие всего этого, экспрессностью определений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 00-03-32389а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жизнь растений. Т.2. Грибы / Под ред. М.В. Горленко. М.: Просвещение, 1976. С. 427-428.
2. Karlson-Borga A., Jonson P., Rolfsen W. Specific IgE antibodies to 16 widespread mold genera in patients with suspected mold allergy // Ann. Allergy. 1989. V. 63, № 1. P.521-526.
3. Биосенсоры: основы и приложения / Под ред. Э.Тернера, И.Карубе, Дж. Уилсона. М.: Мир, 1992. 616 с.
4. Теория и практика иммуноферментного анализа / Под ред. А.М. Егорова. М.: Высшая школа, 1991. 288с.
5. Palmer D.A., Edmonds T.E., Seare N.J. Flow Injection Immunosensor for Theophylline // Anal. Lett. 1993.V.26, № 7. P.1425-1439.
6. Simultaneous detection of three drugs labeled by cationic metal complexes at a nafion-loaded carbon paste electrode / A. Bordes, B. Schollhorn, B. Limoges, C.Degrand // Talanta. 1999.V.48, № 1. P.201-208.
7. Определение вируса крапчатости гвоздики с помощью иммуноферментного электрода / Э.П. Медянцева, Ли Фа-Шень, О.В. Федосеева и др. // Прикл. биохимия и микробиология. 1993. Т.29, №4. С.619-624.
8. Определение антигена *Phytophthora infestans* с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора / Э.П. Медянцева, М.П. Кутырева, Е.В. Халдеева и др. // Журн. аналит. химии. 1999. Т.54, №12. С.1294-1299.
9. Immunochemical assay in combination with homogeneous enzyme-labeled antibody conjugation for rapid detection of Salmonella/Z.Yang, Y.Li, C.Balagtas, M.Slavik, D.Paul // Electroanalysis. 1998.V.10, № 13. P.913-916.
10. 1-Naphthyl phosphate as an enzymatic substrate for enzyme-linked immunomagnetic electrochemistry / A.G.Gehring, J.D.Brewster, P.L.Irwin, S.I.Tu, L.J.Vanhouten/ / J.of Electroanal. Chem. 1999.V.469, № 1. P.27-33.
11. Crowley E.L., Osullivan C.K., Guibault G.G. Increasing the sensitivity of *Listeria monocytogenes* assays: evaluation using ELISA and amperometric detection // Analyst. 1999.V. 124, № 3. P. 295-299.
12. Вольтамперометрический контроль иммунологических реакций // Журн. аналит. химии. 1993. Т.48, № 10. С.1632-1638.
13. Кузнецов Б.А., Шумакович Г.П. Полярографический анализ микроколичеств белков / Э.П. Медянцева, С.С. Бабкина, М.Г. Вертлиб и др. // Методы современной биохимии. М.: Наука, 1975. С.102-106.
14. Гейровский Я., Кута Я. Основы полярографии. М.: Мир. 1965. 599 с.
15. Плэмбэк Дж. Электрохимические методы анализа: Основы теории и применение. М.: Мир, 1985. С.387.
16. Медянцева Э.П., Будников Г.К., Бабкина С.С. Ферментный электрод на основе иммобилизованной холинэстеразы в анализе потенциальных загрязнителей окружающей среды // Журн. аналит. химии. 1990. Т.45, №8. С.1386-1389.
17. Ферментный электрод на основе иммобилизованной холинэстеразы/Г.К.Будников, Э.П.Медянцева, А.В.Волков, С.С. Аронзон // Журн. аналит. химии. 1983. Т. 38, № 7. С.1283-1288.

* * * * *